



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Fisiología Vegetal

Evaluación de la actividad antioxidante de frambuesas comerciales

Antioxidant activity evaluation in commercial raspberries

Avaliación da actividade antioxidante en framboesa comercias

Alejandro Cés Martínez

Trabajo de fin de grado

Fecha de defensa: 19 de septiembre de 2016

Dirigido por la Dra. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga

Facultad de Ciencias

TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. Maria de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Evaluación de la actividad antioxidante de frambuesas comerciales", presentado por Alejandro Cés Martínez para a súa defensa ante o tribunal cualificados

En A Coruña a 12 de Septiembre del 2016.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

Indice

<u>Resumen/Abstract</u>	1
<u>Palabras clave/Keywords</u>	1
1. <u>Introducción</u>	2
1.1. Tipos de cultivos agrícolas: Tradicional vs Ecológico.....	3
1.2. Compuestos fenólicos.....	5
1.3. Capacidad antioxidante.....	6
2. <u>Objetivos</u>	7
3. <u>Material y métodos</u>	8
3.1. Determinación de características físico-químicas de frutos de <i>Rubus idaeus L</i>	8
3.2. Extracción compuestos fenólicos.....	8
3.2.1. Métodos de extracción.....	8
3.2.2. Determinación de contenido de fenoles totales.....	9
3.2.3. Determinación de la actividad antioxidante con DPPH.....	9
3.2.3.1. Curva patrón de Trolox.....	9
3.3. Análisis estadístico.....	9
4. <u>Resultados y discusión</u>	10
4.1. Características físico-químicas de frutos de <i>Rubus idaeus L</i>	10
4.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	11
4.2.1. Extracción de compuestos fenólicos.....	11
4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante utilizando el método DPPH.....	13
5. <u>Conclusiones</u>	16
6. <u>Bibliografía</u>	17

Resumen

En el trabajo presentado a continuación realizaremos un estudio sobre la capacidad antioxidante en frutos de *Rubus idaeus L.*, conocidos comúnmente como frambuesas. Para este estudio contamos con frambuesas cultivadas mediante dos métodos diferentes: cultivo tradicional/industrial *versus* cultivo ecológico con el fin de hacer una comparación entre sus frutos y observar si se aprecian diferencias tanto en la cantidad de fenoles totales como en la capacidad antioxidante. También hemos realizado un estudio comparativo sobre las características físicas de los frutos. Para la extracción del concentrado hemos utilizado tres disolventes: Metanol al 80%, acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético y agua, siendo el primero el más eficaz para la extracción en ambos tipos de frutos. Para la determinación de la capacidad antioxidante hemos utilizado un método espectrofotométrico basado en la decoloración de DPPH.

Abstract

In the document written below we will carry out a study on the antioxidant capacity in fruits of *Rubus idaeus L.*, commonly known as raspberries. For this study we have grown raspberries by two different methods: traditional/industrial farming versus organic farming in order to make a comparison between their fruits and see if differences can be seen both in the amount of total phenolics and antioxidant capacity. We have also made a comparative study of the physical characteristics of the fruits. For the extraction of the concentrate we used three solvents: 80% methanol, 70% acetonitrile with 4% acetic acid and water, being the first the most effective for extracting in both types of fruits. For the determination of the antioxidant capacity we used a spectrophotometric method: related with DPPH discoloration.

Palabras clave

Rubus idaeus L., frambuesa, cultivo tradicional/industrial, cultivo ecológico, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, DPPH

Key words

Rubus idaeus L., raspberry, traditional/industrial farming, organic farming, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH

1. Introducción

La frambuesa es un fruto rojizo de tipo drupa que proviene de una planta perteneciente a la familia de las rosáceas, conocida comúnmente como frambuesa (*Rubus idaeus* L.) (Muñoz Garmendia & Navarro, 1998).



Figura 1: A la izquierda observamos un ejemplar de la especie *Rubus idaeus*. A la derecha podemos ver más en detalle los frutos de esta.

Tomada de: <http://articulo.mercadolibre.com.ar/MLA-609298096-rapsberry-frambuesa-gigante-rubus-idaeus-semillas-pplantas- JM>

Tomada de: https://es.wikipedia.org/wiki/Rubus_idaeus

Esta especie, de tipo arbustivo, cuya altura varía entre los 40 y 60 centímetros, se caracteriza por poseer tallos suberectos, de 3.5 a 5 milímetros de diámetro, de color verde o castaños/rojizos, muy cortos, glabros (a veces con pelos aislados), y con acúleos en un número variable. Sus hojas son pinnaticompuestas, con 3, 5 o 7 folíolos, caducas y aserradas. El haz de estas está recubierto por pelos muy cortos, y el envés es blanco-tomentoso. Su inflorescencia es más o menos cilíndrica, con sépalos grisáceo-tomentosos y 6-7 pétalos blancos de forma oval. Anteras glabras. Carpelos blanco-tomentosos (Muñoz Garmendia & Navarro, 1998).



Figura 2: Observamos en detalle una de las flores que forman parte de la inflorescencia de *Rubus idaeus*.

Tomada de: <http://plantararboles.blogspot.com.es/2013/12/arboles-y-arbustos-naturalizados-en.html>

Suelen encontrarse en claros de bosques húmedos de diferentes tipos, principalmente de hayedos, pero también aparecen en bosques de pinares, robledales, abedulares, etc. y en matorrales de alta montaña. Esta especie puede habitar en alturas comprendidas entre los 500 hasta los 2200 metros. Prefiere las zonas sombrías y frescas, aunque soporta grandes cambios de temperatura.

Las frambuesas se emplean en la preparación de mermeladas, jaleas, licores, etc. Su jugo y su jarabe se utilizan como aromatizantes (Muñoz Garmendia & Navarro, 1998). Pero lo que ha hecho que este fruto sea el protagonista de este trabajo es la presencia de compuestos fenólicos en su interior. Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de captar radicales libres, lo cual los convierte en sustancias antioxidantes, valoradas por sus beneficios para la salud humana.

1.1 Tipos de cultivos agrícolas: Tradicional vs Ecológico

La agricultura tradicional/industrial se basa en dos objetivos: la maximización de la producción y de las ganancias. Para alcanzar estos objetivos se han desarrollado prácticas que no tienen en cuenta las poco conocidas consecuencias a largo plazo ni la dinámica ecológica de los agroecosistemas. Las seis prácticas básicas que constituyen la columna vertebral de la agricultura tradicional son: la labranza intensiva, los monocultivos, la irrigación, la aplicación de fertilizantes inorgánicos, el control químico de las plagas y la manipulación genética de los cultivos. Cada una de las prácticas mencionadas anteriormente es utilizada por su contribución individual a la productividad, sin embargo estas se integran formando parte de un sistema, en el cual cada una de ellas refuerza el uso de otra (Gliessman, 2002).



Figura 3:
Monocultivo de *Rubus idaeus*.
Imagen representativa del cultivo tradicional.

Tomada de: <http://www.informador.com.mx/economia/2015/572412/6/jalisco-tiene-sembrados-cultivos-de-frutales-que-les-favorece-el-frio.htm>

Entre los problemas asociados a este tipo de agricultura encontramos la degradación del suelo, uso excesivo y pérdida de agua, contaminación ambiental, pérdida de diversidad genética, etc.

Las frambuesas de cultivo tradicional/industrial con las que realizamos el trabajo aquí presente pertenecen a la empresa castellano leonesa IDEAL FRUITS, dedicada al cultivo de bayas y hortalizas. En su página web (<http://www.idealfruits.es/index.html>) encontramos información específica de sus frambuesas, en la que nos informa que estas bayas están disponibles durante todo el año y el lugar de procedencia dependiendo del momento anual en el que se adquieran (Figura 4), también nos informa sobre las características de los recipientes de venta y adjuntan algunas imágenes de los frutos en cuestión. A mayores como información de todos sus productos garantizan calidad e innovación.



Tomada de: <http://www.idealfruits.es/pdf/ficha%20frambuesas.pdf>

Figura 4: Origen y disponibilidad de las frambuesas de la empresa IDEAL FRUITS.

La agricultura ecológica tiene como objetivo principal la sostenibilidad del ecosistema, esto significa que posee la capacidad de ir autorenovando la biomasa de éste a lo largo del tiempo, es decir, el sistema es capaz por si solo de perpetuarse en el tiempo. Esta cualidad es imposible de demostrar en el presente, y puesto que el futuro queda fuera de nuestro alcance, la solución es observar cómo afectan una o varias prácticas sobre el sistema alejándolo o no de dicha sostenibilidad (Gliessman, 2002).

Con los conocimientos actuales podemos sugerir que como mínimo este tipo de agricultura debería:

- Tener el mínimo de efectos nocivos sobre el ambiente, y no liberar sustancias tóxicas o dañinas a la atmósfera, aguas superficiales o subterráneas.
- Preservar y reconstruir la fertilidad del suelo, prevenir la erosión y mantener la salud ecológica del suelo.
- Usar el agua de forma que permita la recarga de los acuíferos y su uso por parte de la población humana y otros elementos del ecosistema.
- Hacer uso de los recursos dentro del agroecosistema, incluyendo las comunidades cercanas, remplazando los insumos externos con un mejor ciclo de nutrientes, adecuada conservación y amplio conocimiento ecológico.

- Valorar y conservar la biodiversidad, tanto en los paisajes silvestres como en los domesticados.
- Garantizar la igualdad en el acceso a las prácticas agrícolas apropiadas, al conocimiento y a la tecnología así como permitir el control local de los recursos agrícolas.

Entre los problemas asociados a este tipo de agricultura encontramos la menor vida útil y peor aspecto físico de los productos ecológicos, el mayor precio de los mismos, etc. y también la menor productividad por hectárea que se da en este tipo de cultivos.

Las frambuesas de origen ecológico pertenecen a la empresa onubense Bionest, dedicada a la producción ecológica de diversas clases de frutos. En su página web (<http://www.bionest.es/ES/bio.html>) nos informan de que sus métodos de cultivo ecológicos están certificados y de que son el mayor productor español de “berries” ecológicas en el mercado europeo. Encontramos también una descripción a cerca de como realizan el cultivo de sus productos. Informan de que los campos donde son cultivadas de forma orgánica necesitan tres temporadas antes de conseguir el certificado, éste posteriormente debe ser renovado anualmente. Sólo utilizan fertilizantes naturales como el estiércol, compost y minerales de la roca para mantener la fertilidad del suelo. Los insecticidas son de tipo natural, como feromonas, jabones y aceites latentes, también utilizan insectos beneficiosos para mantener las poblaciones de plagas con bajo nivel de riesgo. Las malezas son controladas por los cultivos de cobertura y los métodos mecánicos en lugar de herbicidas.

1.2 Compuestos fenólicos

El término compuesto fenólico incluye a un amplio rango de sustancias vegetales que poseen un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo. Los fenólicos vegetales son un grupo químicamente muy heterogéneo de casi 10.000 compuestos individuales. Algunos son solubles en agua ya que se encuentran combinados con azúcares en forma de glicósidos, y normalmente están localizadas en la vacuola. Otros solamente son solubles en solventes orgánicos, y otros son polímeros grandes e insolubles (Díaz & Bernal, 2011).

En relación con su diversidad química, los fenólicos juegan una gran variedad de papeles en la planta. Muchos sirven como compuestos de defensa frente a herbívoros y patógenos. Otros funcionan como soporte mecánico, atrayendo a los polinizadores y dispersores de frutos, absorbiendo las radiaciones ultravioleta perjudiciales, o reduciendo el crecimiento de las plantas cercanas (Díaz & Bernal, 2011).

Otra función, la más interesante para nuestro trabajo, es la capacidad antioxidante frente a los radicales libres generados por el metabolismo. Se sabe que como consecuencia del metabolismo normal de cualquier planta, en sus células se forman radicales libres como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las que los átomos de oxígeno presentan diferentes grados de excitación electrónica (proceso que también ocurre en otros seres vivos como es nuestro caso). Siguiendo con la información recogida en Taiz et al. (2015), entre las ROS se encuentran los radicales superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , hidroxiperóxido $HO\cdot_2$ o el hidroxilo $OH\cdot$. Todas estas moléculas se producen en diferentes compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocondrias, pared celular, fracción microsomal o peroxisomas. Ante un incremento de los radicales libres en la célula, para evitar daños en la misma, los vegetales sintetizan otro tipo de compuestos que actúan como antioxidantes para restaurar el equilibrio fisiológico.

Entre los compuestos fenólicos detectados en frambuesas se encuentran: vitamina C, derivados del ácido eláxico, antocianos y flavonoles, (García Alonso et al., 2002).

1.3 Capacidad antioxidante

Se puede definir antioxidante biológico como aquella molécula que, estando presente en menor concentración que un sustrato oxidable, disminuye o impide la oxidación de este sustrato (Benzie & Strain, 1996). Los antioxidantes pueden ser sustancias de origen diverso como enzimas o metabolitos secundarios, dentro de los segundos se encuentran clasificados los compuestos fenólicos de los que hablamos anteriormente.

Para determinar la capacidad antioxidante en nuestros frutos de frambuesa utilizamos un ensayo de decoloración de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Se trata de un ensayo espectrofotométrico, que se basa en el descenso de la absorbancia a 515 nanómetros de una solución metanólica de radical DPPH (cromógeno oxidado) en presencia de extracto de la planta a estudiar, usando la solución del radical DPPH como blanco. La pérdida de color es proporcional al grado de captura del radical DPPH, y nos da una medida eficiente de la capacidad antioxidante del extracto vegetal (Teixeira et al., 2013).

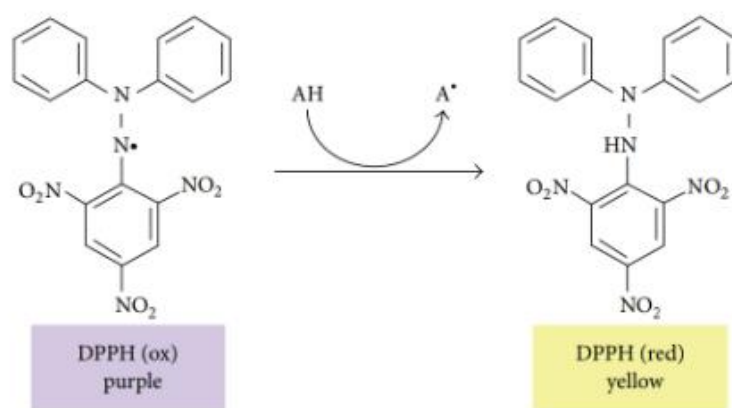


Figura 5: Reacción de reducción de DPPH (Teixeira et al., 2013).

Para determinar la capacidad antioxidante de nuestros extractos en función del número de radicales hidroxilo, utilizamos Trolox. Este compuesto es un análogo soluble de la vitamina E y es utilizado como flavonoide patrón en estudios de actividad antioxidante (Ozgen et al., 2006).

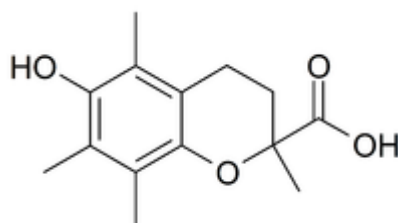


Figura 6: Molécula de Trolox.

2. Objetivos

1. Determinación de las características físico-químicas de frutos de frambuesa procedente del cultivo tradicional y ecológico.

2. Estudio comparativo sobre la capacidad de extracción de compuestos fenólicos utilizando diferentes solventes: metanol al 80%, acetonitrilo al 70 con 4% de ácido acético y agua destilada.

3. Determinación de la actividad antioxidante mediante la puesta a punto del método espectrofotométrico del DPPH, utilizando el Trolox como patrón.

3. Material y métodos

3.1 Determinación de características físico-químicas de frutos de *Rubus idaeus* L.

Procedimos a la caracterización físico-química de frutos comerciales de frambuesa, tanto las cultivadas de manera tradicional/industrial como a las cultivadas de manera ecológica, mediante la determinación del peso fresco, peso seco, tamaño y el contenido en sólidos solubles (Prior et al., 1998).

El peso medio se determinó mediante dos métodos, por un lado, se pesaron 10 frutos individualmente y se halló la media, y por otro se halló el cociente entre el peso de un grupo de frutos y el número de frutos presentes en la muestra.

El peso seco se determinó por triplicado tras introducir las frambuesas en una estufa a 70°C durante 72 horas.

El tamaño medio se determinó midiendo 10 frutos con un calibre tanto la distancia desde el punto de inserción del tallo hasta el punto opuesto como la línea perpendicular a ésta (alto y ancho), hallando después una media de estos dos valores.

El contenido en sólidos solubles se determinó midiendo en un refractómetro Shibuye modelo 15287(0 – 32%) el zumo obtenido tras exprimir frutos de frambuesa a través de 4 capas de gasas.

3.2 Extracción compuestos fenólicos

3.2.1 Métodos de extracción

Para poder comparar los diferentes tipos de extracción, una vez establecidas las características físico-químicas de nuestros frutos, se procedió a su congelación a -80°C. Procedimos a la extracción en una proporción 1:2 (p/v) de los fenoles hidrofílicos en agua y los lipofílicos en metanol al 80% y en acetonitrilo al 70% acidificado al 4% de ácido acético. Se homogeneizaron con un homogeneizador Micra D-I (Art moderne Labortechnik), siendo posteriormente centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se guardó en tubos eppendorf a -80°C para posteriores análisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Extracción con agua:

Siguiendo un protocolo modificado a partir del trabajo de Kraujalyte (Kraujalyte et al., 2015) procedimos a homogeneizar en agua destilada frambuesas completas, en una proporción 1:2 (p/v).

Extracción con metanol 80%:

Siguiendo el método modificado de Díaz (Díaz et al., 2001) realizamos una extracción 1:2 (p/v) en metanol al 80%, seguido de una incubación a 70°C durante 30 minutos.

Extracción con acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4%:

Utilizando el método descrito por Prior (Prior et al., 1998) realizamos una extracción en acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4% con una relación 1:2 (p/v).

3.2.2 Determinación de contenido de fenoles totales

Método de Folin-Ciocalteu y recta de calibrado de ácido gálico:

Para medir el contenido de fenoles totales usamos el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método de Slinkard & Singleton (1977) modificado por Kraujalyte et al. (2015). Mezclamos 100 µl de muestra con 1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces. La muestra procedente de extracción de frambuesa fue diluida hasta llegar al volumen final de muestra de 100 µl. Tras 4 minutos, le añadimos a cada tubo 1ml de Na₂CO₃ al 7% y 400 µl de agua destilada y se incubaron los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Procedimos a la lectura de la absorbancia a 760nm. Para la recta de calibrado utilizamos disoluciones de ácido gálico (de 0 mg/ml hasta 0,2mg/ml). Los resultados se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico por ml de extracto (mg GAE/ml) y por mg de peso fresco de muestra (mg GAE/ g PF).

3.2.3 Ensayo con DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en presencia de extracto de frambuesa, usando la solución del radical DPPH como blanco. La pérdida del color es proporcional al grado de captura del radical DPPH, y da una medida de la eficiencia antioxidante de los extractos. Los valores fueron expresados en comparación a un compuesto patrón, el Trolox. Preparamos una solución de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 1mM. Esta disolución madre se diluyó en metanol hasta llegar a valores de absorbancia cercanos a 0,800 y en cada uno de los casos se hicieron reaccionar 50 µl del estándar antioxidante con 950µL de DPPH.

3.2.3.1 Curva patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1 mM en etanol puro y a partir de ella preparamos disoluciones a diferentes concentraciones (de 10, 20, 30, 40 y 50 µM). En este caso se midió la absorbancia de las muestras a los 3 minutos.

$$\text{Absorbancia}_{515\text{ nm}} = -0,007 \cdot [\text{equivalentes de TROLOX}] + 0,8337$$

3.3 Análisis estadístico

Para el estudio de actividad antioxidante y compuestos fenólicos, los ensayos se realizaron por triplicado con frutos congelados. Los datos se expresan con un análisis de la desviación estándar. La regresión lineal se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2010.

4. Resultados y discusión

4.1 Características físico-químicas de frutos de *Rubus idaeus L.*

En la figura 7 se pueden observar los dos tipos de frambuesa estudiadas en nuestro trabajo. A simple vista se puede apreciar como las frambuesas procedentes de cultivo tradicional presentan un mejor aspecto que las ecológicas. Este aspecto estaría relacionado con una menor pérdida de agua, color y forma más homogénea con el paso del tiempo. A nivel organoléptico, destacar que las frambuesas ecológicas presentaban un sabor más agradable y persistente.

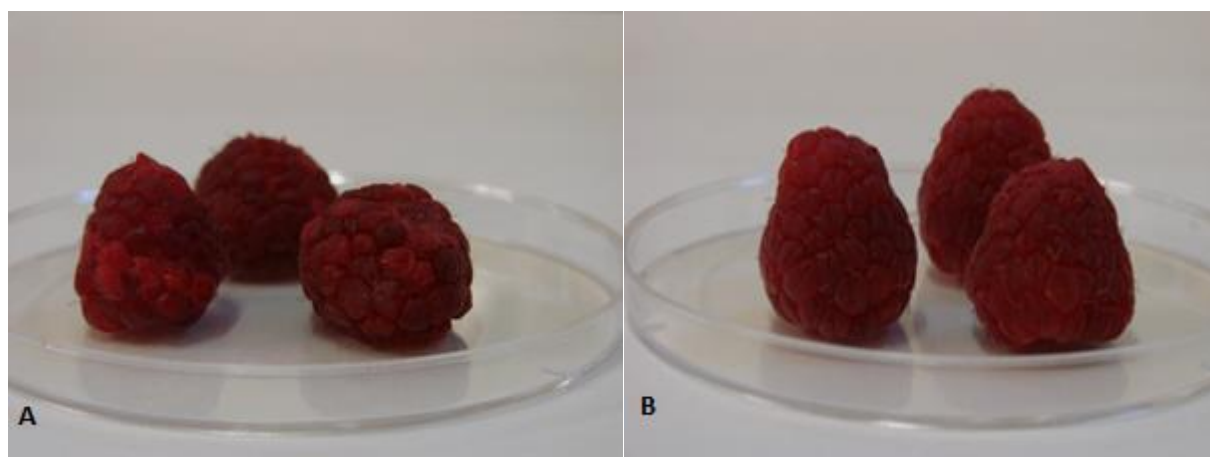


Figura 7: A: Frambuesas cultivadas mediante métodos ecológicos. B: Frambuesas cultivadas mediante métodos tradicionales.

El diámetro medio de las frambuesas cultivadas con métodos tradicionales/industriales es de 21.21 mm \pm 1.55. Su altura media es de 23.01 mm \pm 2.04. Su peso fresco medio es de 4.95 g \pm 0.65, mientras que su peso seco medio es de 1.81 g \pm 0.04. Sus sólidos solubles son de 9.2° Bx (grados Brix) (Tabla 1).

Diámetro (mm)	Altura (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Sólidos solubles (° Bx)
21.21 \pm 1.15	23.01 \pm 2.04	4.95 \pm 0.65	1.81 \pm 0.04	9.2 \pm 0.00

Tabla 1: Características físico-químicas de frambuesas tradicionales/industriales.

El diámetro medio de las frambuesas cultivadas con métodos ecológicos es de 22.52 mm \pm 2.17. Su altura media es de 20.95 mm \pm 1.65. Su peso fresco medio es de 4.80 g \pm 0.76, mientras que su peso seco medio es de 1.93 g \pm 0.00. Sus sólidos solubles son de 7.1° Bx (grados Brix) (Tabla 2).

Diámetro (mm)	Altura (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Sólidos solubles (° Bx)
22.52 \pm 2.17	20.95 \pm 1.65	4.80 \pm 0.76	1.93 \pm 0.00	7.1 \pm 0.00

Tabla 2: Características físico-químicas de frambuesas ecológicas.

Si analizamos los datos obtenidos podemos observar que no existen diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo, siendo el dato más salientable la ligera diferencia en

azúcares solubles. Comparando estos resultados con los obtenidos por Hyun-Hee et al. (2008) en frambuesas de origen coreana, observamos que nuestras frambuesas, tanto las producidas mediante cultivo tradicional/industrial como las producidas mediante cultivo ecológico, son mayores en cuanto a tamaño, puesto que las frambuesas coreanas rondan un peso de 3.3 ± 0.1 gramos. En lo referente a los sólidos solubles ($^{\circ}$ Bx), las frambuesas del estudio de Hyun-Hee et al. (2008) son más ricas en el contenido en azúcares alcanzando un $11.0 \pm 0.1^{\circ}$ Bx.

4.2 Determinación de la capacidad antioxidante

4.2.1 Extracción de compuestos fenólicos

Métodos de extracción y determinación de fenoles totales

Sobre las extracciones realizadas en el cultivo tradicional/industrial observamos que, con el solvente que se consigue mayor concentración de fenoles es el metanol al 80%; solvente de carácter lipofílico, seguido del acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético; que también es un solvente de carácter lipofílico, y en última posición el agua destilada; solvente de carácter hidrofílico. Este es el resultado obtenido cuando nos referimos a miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra. Sin embargo, este orden no se mantiene cuando medimos los fenoles en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco, en este caso el metanol al 80% sigue manteniendo la primera posición pero seguido del agua destilada y en última posición el acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético (Tabla 3).

Sobre las extracciones realizadas en el cultivo ecológico observamos que, con el solvente que se consigue mayor concentración de fenoles es con el metanol al 80%, seguido del acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético y en última posición el agua destilada. Esta mayor extracción se da tanto en miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra como en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco (Tabla 3).

Comparando estos resultados con los obtenidos por Stajčić et al. (2012) observamos que los extractos de los cultivos de frambuesa con los que trabajaron poseen mayor concentración de fenoles en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. El solvente utilizado por Stajčić et al. (2012) fue metanol al 80% con 0.05% de ácido acético. El mismo resultado obtenemos al comparar nuestro estudio con el de Castilho Maro et al. (2012), en este caso el solvente utilizado para la extracción fue metanol al 50%, y en el proceso realizaron tres extracciones consecutivas.

Una posible causa de que en los estudios mencionados anteriormente se consigan mayores cantidades de extracción puede deberse al solvente utilizado, así como al número de extracciones consecutivas.

Cultivo tradicional/industrial		
Solventes	Concentración (mg/ml)	mg/g PF
Metanol 80%	0.133	0.243
Acn 70%	0.0995	0.218
Agua destilada	0.0962	0.237

Cultivo ecológico		
Solventes	Concentración (mg/ml)	mg/g PF
Metanol 80%	0.151	0.285
Acn 70%	0.128	0.264
Agua destilada	0.105	0.243

Tabla 3: Contenido en fenoles totales.

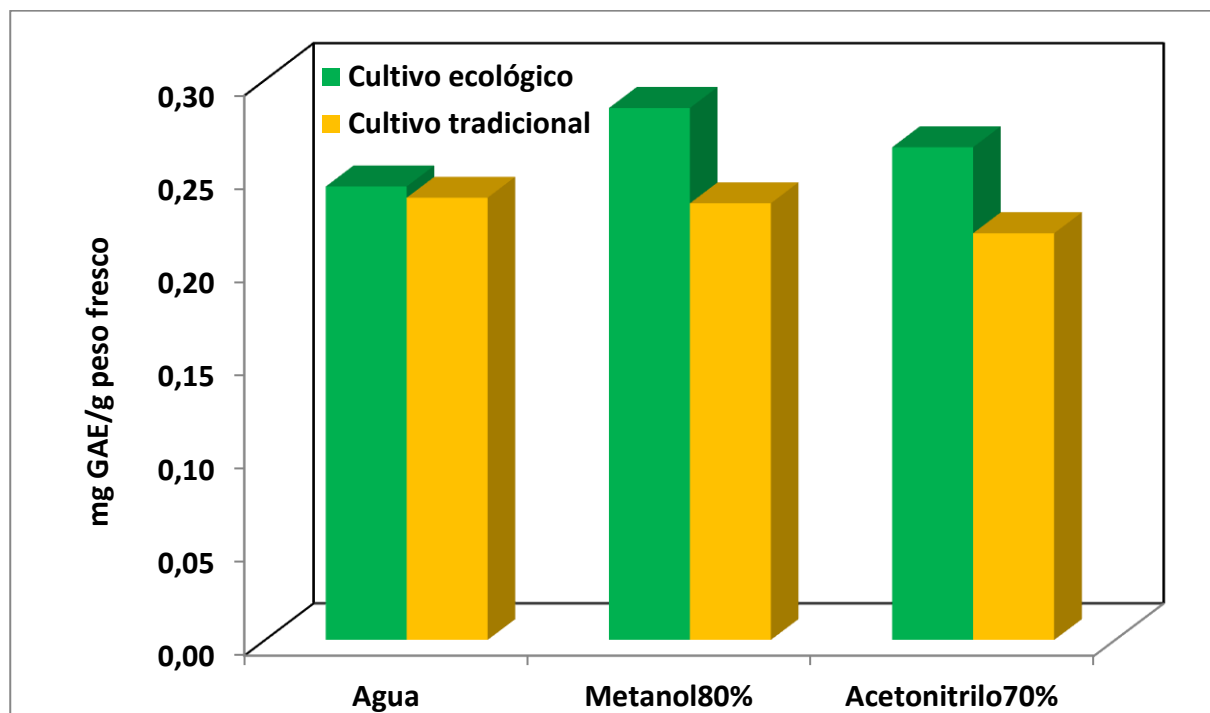


Figura 8: Contenido en fenoles totales según el tipo de extracción.

En la figura 8 se muestra una comparativa en la concentración de fenoles totales en función del tipo de cultivo. Vallverdú-Queralt et al. (2012) afirman que la biosíntesis de compuestos fenólicos de las plantas está fuertemente influenciada por el cultivar y por el modo de fertilización, y que los metabolitos secundarios con base de carbono, como los compuestos fenólicos, son por lo general mayor en plantas cultivadas mediante métodos ecológicos debido al papel defensivo de estos en condiciones de estrés. Las frambuesas provenientes del cultivo ecológico poseen una ligera mayor concentración de compuestos fenólicos tanto hidrofílicos como lipofílicos.

4.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante utilizando el método DPPH

En primer lugar era necesario conocer el rango de diluciones necesarias para llevar a cabo el ensayo, dado el intenso color de las muestras de frambuesa. Esto se realizó poniendo en contacto el extracto con una solución del radical libre. La dejamos actuar de modo que la intensidad de color, es decir, la concentración del radical oxidado fue disminuyendo en función de la capacidad secuestrante del extracto y monitorizamos con el espectrofotómetro ese descenso de la absorbancia. Se midió por espectrofotometría la absorbancia de un blanco de reacción (solución de radical libre-sin extracto antioxidante) y la de las mezclas de reacción de las distintas muestras. Consideramos la absorbancia del blanco como 100% y las absorbancias de las muestras se expresan en referencia a ese valor.

Calculamos el porcentaje de pérdida del color del radical por acción del extracto según la ecuación (Chinprahast et al., 2016):

$$\% \text{ Decoloración} = [1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{blanco}})] \times 100$$

La pérdida de color del compuesto coloreado es proporcional a su reducción y por lo tanto a la actividad antioxidante del extracto.

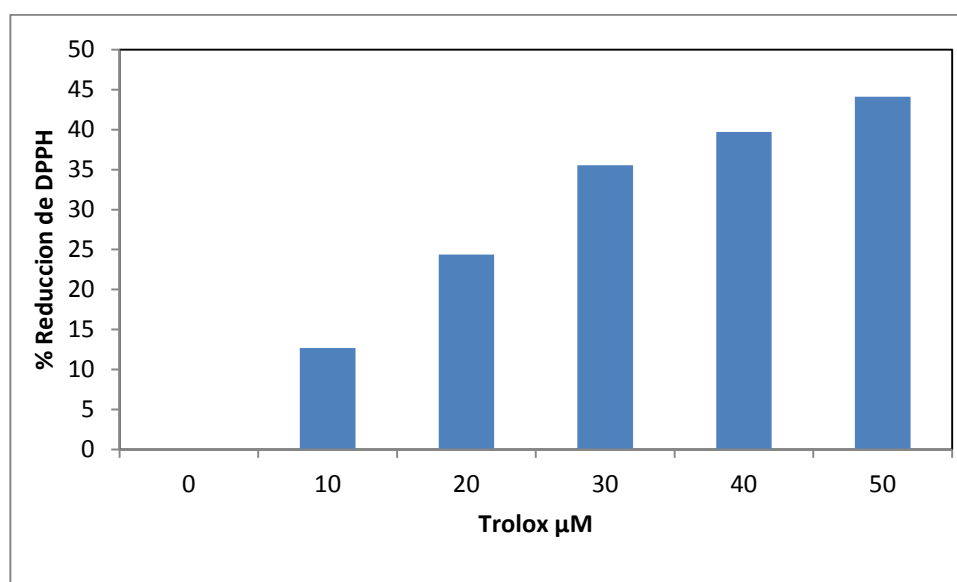


Figura 9: Efecto de la concentración de Trolox sobre la reducción del DPPH.

Como podemos observar en la figura 9 al aumentar la concentración de Trolox, que es un análogo soluble de la vitamina E, aumenta el porcentaje de reducción de DPPH. A efectos prácticos se observa como el DPPH, de color azul en su estado oxidado, vira a un tono cada vez más traslúcido, es decir, se reduce, a medida que aumentamos las concentraciones de Trolox. Por tanto sabemos que el Trolox está provocando esta reducción, o lo que es lo mismo está actuando como antioxidante. En este ensayo hemos utilizado el Trolox como patrón, para así tener una referencia a la hora de medir la capacidad antioxidante de nuestras muestras de frambuesa.

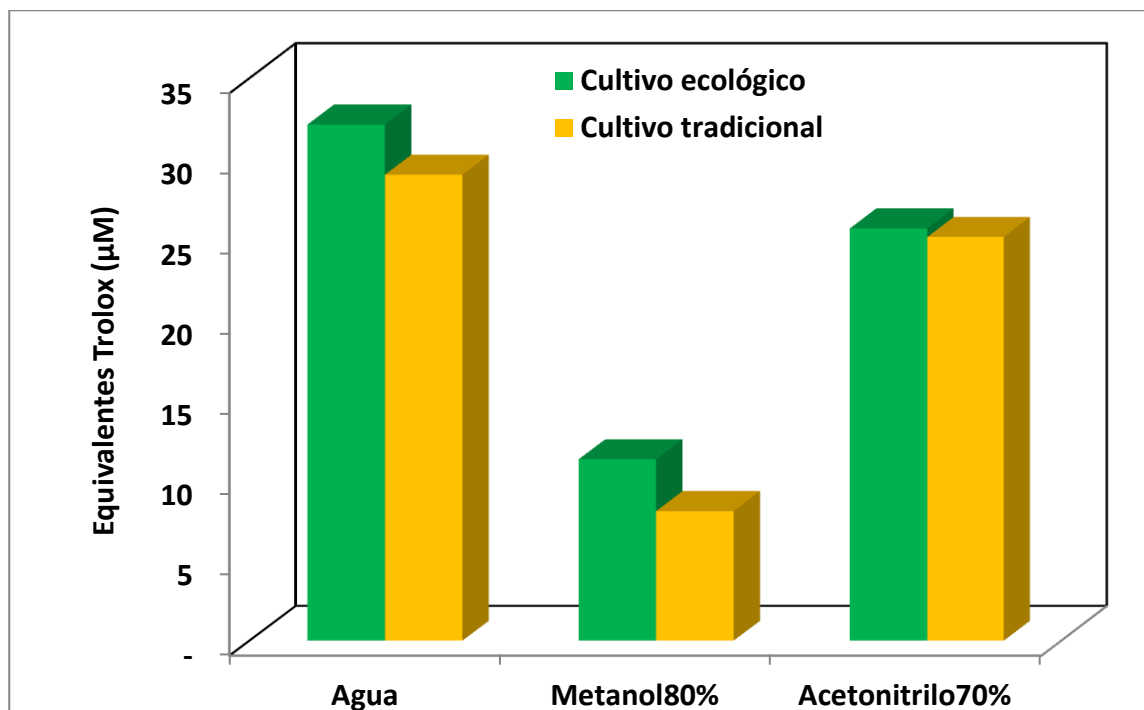


Figura 10: Capacidad antioxidante de las muestras de frambuesas según tipo de cultivo y solvente utilizado para extraer los fenoles totales.

En la figura 10 observamos la capacidad antioxidante de nuestras muestras en equivalentes de Trolox (μM). A primera vista podemos observar que de forma general las muestras de frambuesa cultivadas mediante métodos ecológicos poseen mayor número de equivalentes de Trolox que las muestras de frambuesa cultivadas mediante métodos tradicionales/industriales, lo que se traduce en que las primeras poseen mayor capacidad antioxidante.

Si nos fijamos en los diferentes solventes observamos que con el solvente que mayor número de equivalentes de Trolox conseguimos es el agua, seguido del acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético y en última posición el metanol. La razón de que el agua sea la que más equivalentes de Trolox posea para ambos tipos de cultivo, a pesar de ser el solvente que menor logró una menor extracción de compuestos fenólicos (Tabla 3), podría deberse al patrón que hemos elegido. Como ya dijimos anteriormente el Trolox es un análogo soluble de la vitamina E y el agua es un solvente de fenoles hidrofílicos, por lo que se ve beneficiada por sus características físico-químicas frente al metanol al 80% y el acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético, que son solventes de fenoles lipofílicos.

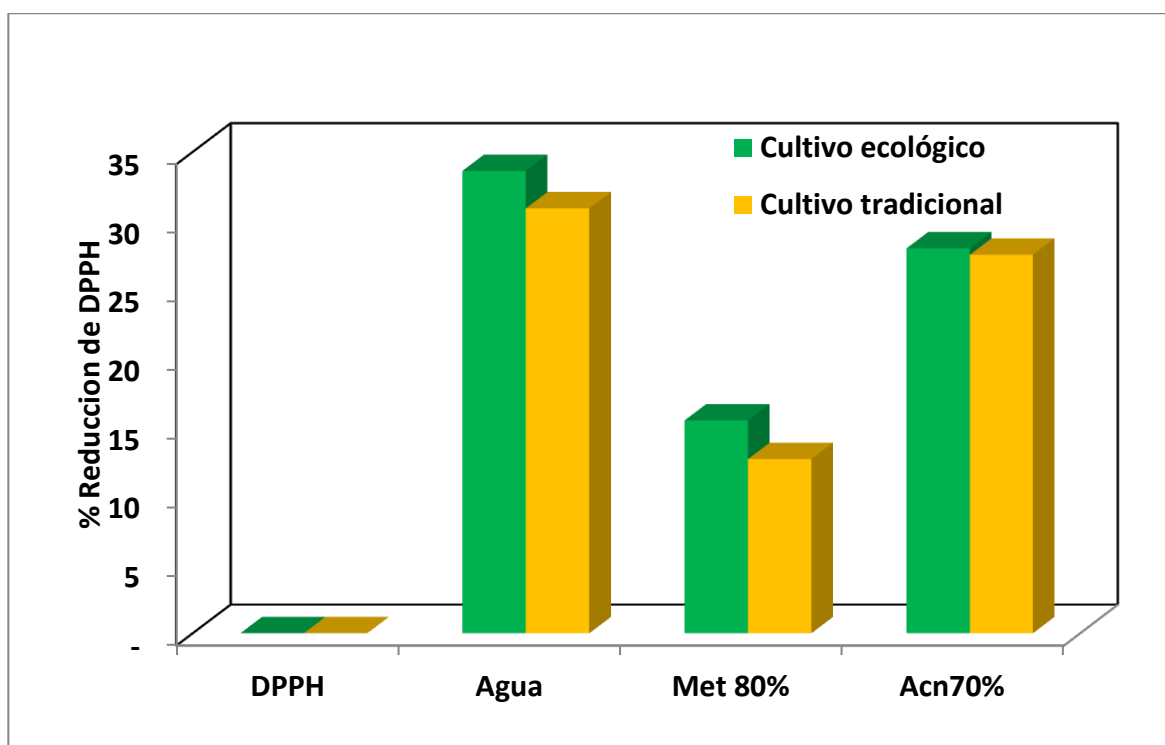


Figura 11: Efecto del contenido de los compuestos fenólicos sobre el porcentaje de reducción del DPPH.

En la figura 11 observamos que hay una correlación positiva entre número de equivalentes de Trolox y capacidad de reducción del DPPH. En esta figura tenemos el DPPH como blanco y observamos que al poner este en contacto con los extractos de compuestos fenólicos totales de nuestras frambuesas el DPPH se reduce. Observamos que también se mantiene la tendencia referente a las muestras cultivadas mediante un método de cultivo ecológico, siendo estas las que poseen mayor poder reductor, aunque en el caso del acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético esta diferencia es mínima.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Trivedi et al. (2015) en *Rubus idaeus* (var. *biflorus*), observamos que nuestros cultivos de frambuesas, tanto el tradicional/industrial como el ecológico, poseen un menor número de equivalentes de Trolox por gramos de peso fresco ($\mu\text{M TE/ g PF}$). Trivedi et al. (2015) obtuvieron $2.6 \mu\text{M TE/ g PF}$, utilizando como solvente etanol al 50% para la extracción de compuestos fenólicos de su muestra, mientras que nuestros datos (Tabla 4), son ligeramente inferiores en el caso de las extracciones producidas mediante acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético y agua destilada, y la diferencia aumenta cuando estos equivalentes de Trolox son calculados a partir de los datos de extracción con metanol al 80%.

Solvente	$\mu\text{M TE/ g PF}$ cultivo tradicional	$\mu\text{M TE/ g PF}$ cultivo ecológico
Metanol al 80%	0.69	0.82
Acetonitrilo al 70%	1.99	2.19
Agua destilada	2.10	2.18

Tabla 4: Comparación de $\mu\text{M TE/ g PF}$ entre nuestros cultivos tradicional/industrial y ecológico.

5. Conclusiones

- El estudio de las características físico-químicas de las frambuesas procedentes de diferentes tipos de cultivo no arroja diferencias significativas. La frambuesa ecológica a pesar de su peor conservación a temperatura ambiente, presenta mejores características organolépticas.

- Con independencia del método de extracción utilizado hemos observado una ligera mayor presencia de compuestos fenólicos en las frambuesas de origen ecológico. En ambos casos el metanol al 80% aparece como el mejor método de extracción, seguido del acetonitrilo al 70% con 4% de ácido acético en las frambuesas ecológicas. La extracción con agua no presenta diferencias significativas.

- En relación a la capacidad antioxidante medida con DPPH, utilizando Trolox como patrón, se puede observar una correlación positiva entre los equivalentes de Trolox y el porcentaje de reducción del DPPH. Dicha correlación nos muestra una ligera mayor capacidad antioxidante de las frambuesas cultivadas ecológicamente.

5. Conclusions

- The study of the physico-chemical raspberries characteristics from different farming types doesn't produce significant differences. Ecological raspberry despite its worst storage at room temperature, has better organoleptic characteristics.

- Regardless of the extraction method used, we have observed a slight increased presence of phenolic compounds in raspberries organic origin. In both cases the 80% methanol appears as the best method of extraction, followed by 70% acetonitrile with 4% acetic acid in ecological raspberries. Water extraction doesn't show up significant differences.

- In relation to the antioxidant capacity DPPH measured, using Trolox as the standard, we can observe a positive correlation between the Trolox equivalents and the percentage reduction of DPPH. This correlation shows a slightly higher antioxidant capacity of organically grown raspberries.

6. Bibliografía

Benzie, I. & Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, Issue 239, pp. 70-76.

Castilho Maro, L. A., Pio, R., Santos Guedes, M. N., Patto De Abreu, C. M. & Curi, P. N. (2012). Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil. *EDP Sciences*, Volumen 68, pp. 209-217.

Chinprahast, N., Tungsomboon, T. & Nagao, P. 2016. Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 46-53.

Díaz, J. & Bernal, Á. 2011. Capsicinoides y análogos no pungentes en el pimiento. // *Xornadas Técnicas do Pemento do Couto*.

Díaz, J., Bernal, Á., Pomar, F. & Merino, F. 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum L.*) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, pp. 179-188.

García Alonso, J., Periago, M. J., Vidal Guevera, M. L. & Cantos, E. 2002. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. *Anales de Veterinaria de Murcia*, Volumen 18, pp. 103-114.

Gliessman, S. R. 2002. Agroecología: procesos ecológicos en la agricultura sostenible. *CATIE: Turrialba, Costa Rica*, pp. 1-13.

Hyun-Hee, O., Keum-Taek, H., Mu-Yeol, K., Hee-Kwon L. & Sung-Zoo K. 2008. Chemical Characteristics of Raspberry and Blackberry Fruits Produced in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Volumen 37, Issue 6, pp. 738-743.

Kraujalyte, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Cesoniene, L. & Daubaras, L. 2015. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, pp. 583-590.

Muñoz Garmendia, F. & Navarro, C. 1998. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e Islas Baleares. *Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid*, Volumen 6, pp 22-24.

Ozgen, M., Reese, R., Tulio, A., Scheerens, J. & Miller, A. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1151-1157.

Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischer, N., Ehlenfeldt, M., Kaldt, W., Krewer, G. & Mainland, M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 2686-2693.

Slinkard, K. & Singleton, V. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, pp. 49-55.

Stajčić S. M., Tepić A. N., Djilas S. D., Šumić Z. M., Čanadanović-Brunet J. M. & Tumbas V. T. 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Berry Fruits. *University of Novi Sad, Faculty of Technology, Serbia*, pp. 93-105.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. & Murphy, A. 2015. *Plant Physiology and development*. Décimoquinta ed. Sinauer Associates, Inc.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, J. & Borges, F. 2013. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*.

Trivedi, A. K., Verma, S. K. & Tyagui, R. K. 2015. Variability in morpho-physiological traits and antioxidant potential of Rubus species in Central Himalayan Region. *National Bureau of Plant Genetic Resources, India*, pp. 1-8.

URL, 2016. Available at: <http://articulo.mercadolibre.com.ar/MLA-609298096-rapsberry-frambuesa-gigante-rubus-idaeus-semillas-pplantas- JM>

URL, 2016. Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Rubus_idaeus

URL, 2016. Available at:

<http://plantararboles.blogspot.com.es/2013/12/arboles-y-arbustos-naturalizados-en.html>

URL, 2016. Available at: <http://www.bionest.es/ES/bio.html>

URL, 2016. Available at: <http://www.idealfruits.es/index.html>

URL, 2016. Available at: <http://www.idealfruits.es/pdf/ficha%20frambuesas.pdf>

URL, 2016. Available at: <http://www.informador.com.mx/economia/2015/572412/6/jalisco-tiene-sembrados-cultivos-de-frutales-que-les-favorece-el-frio.htm>

Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Medina-Remón, A. & Lamuela-Raventós R. M. 2012. Evaluation of a Method To Characterize the Phenolic Profile of Organic and Conventional Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 3373-3380.